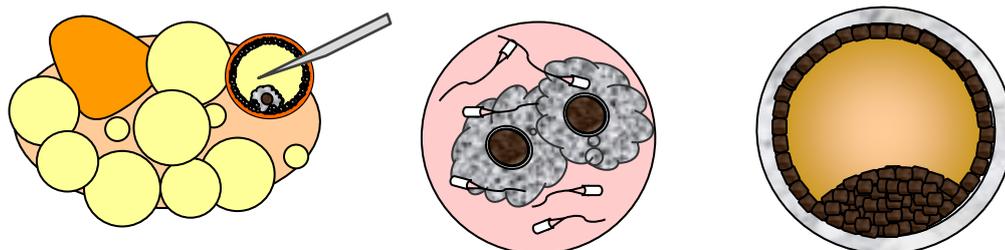


新たな農林水産政策を推進する
実用技術開発事業

体内成熟卵子採取法 マニュアル



独立行政法人家畜改良センター

1. はじめに

牛の育種改良には Multiple Ovulation and Embryo Transfer(MOET)による体内胚を採取し、移植する方法が取られている。しかし、多排卵処置と人工授精による胚生産はドナー牛の栄養状態、生殖器内の環境および卵巣に存在する卵胞の影響を受けることが知られている。特にドナーの卵巣には卵胞波の影響により様々な形態および機能を有した卵胞が存在し、その卵胞のバラツキが多排卵処置に対する反応性として表現されるため、採卵成績にバラツキが大きく、一部のドナー牛では移植可能胚が採取できないという問題がある。そこで、これら MOET の問題を解決するために生体内卵子吸引(Ovum Pick-up; OPU)と体外受精(In Vitro Fertilization; IVF)を利用した胚生産(OPU-IVF)が考案された。牛の IVF 技術には受胎率が低い、流産が多い、過大子の発生、分娩兆候が弱いなどの問題点がある。これらの問題を解決するため、また、胚生産効率を改善するためには体内成熟卵子による IVF が考えられる。さらに、ホルスタイン種においては OPU-IVF により生産した胚をより価値あるものとするために性選別精液の使用による雌胚の生産が考案されている。このような背景の中で我々は OPU により体内成熟卵子を採取する方法および体内成熟卵子と性選別精子による雌胚生産方法について農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業において研究開発に取り組み、一定の成果を得た。

本マニュアルはホルスタイン種体内成熟卵子の採取方法を具体的に紹介するために作成した。

2. 体内成熟卵子の採取法

1) ドナーへの多排卵処置方法

1. ドナーへの多排卵処置方法を図 1 に示した。
2. 発情周期の任意の時期に、CIDR を腔内に挿入する(0 日目)。
3. 5 日目朝に、直径 8mm 以上の卵胞を全て超音波診断装置に接続した採卵針 (COVA ニードル:ミサワ医科工業)で吸引除去する。
4. 6 日目夕方から、FSH 計 30AU を座骨直腸窩の皮下脂肪内(または臀部や頸部の筋肉内)に、夕朝 2 回、計 4 日間漸減投与する。
5. 8 日目夕方に PGF₂α (d-クロプロステノール;225μg)を投与し、9 日目朝に CIDR を除去する。
6. 10 日目の朝に GnRH(酢酸フェルチレリン;200μg)を投与する(0 時間)。
7. GnRH 投与後 25-26 時間目に、直径 5mm 以上の卵胞を全て超音波診断装置に接続した採卵針で卵子を吸引採取する(OPU、図 2)。
8. 黄体を退行させるために、18 日目に PGF₂α (d-クロプロステノール;0.225mg)を投与する。

日	午前 (9:00)	午後 (16:50)
0		CIDR 挿入
1-4		
5	8mm 以上の卵胞吸引除去	
6		FSH 6AU
7	FSH 6AU	FSH 4AU
8	FSH 4AU	FSH 3AU, PGF ₂ α (225μg)
9	FSH 3AU, CIDR 除去	FSH 2AU
10	FSH 2AU, GnRH (200μg)	
11	OPU (11:00 : GnRH 投与後 26h)	IVF (15:00, GnRH 投与後 30h)
12	(体外成熟卵子の IVF) *	

図 1. ドナーへの多排卵処置スケジュール

(*採取された未成熟卵子は 22-23 時間体外成熟培養し、IVF を実施する。)

(解説)

- ① この多排卵処置法は卵胞波の出現、OPU および IVF の時間を考慮して決定した。
- ② 主席卵胞の吸引除去後、新たな卵胞波が出現するのに 1.5 日かかることから、多排卵処置は吸引除去後 1.5 日目から開始した。

- ③ OPU の時間は多排卵処置を実施したドナー牛の排卵時間を調査したところ、98%以上の排卵が GnRH 投与後 26 時間以降に観察されたため、GnRH 投与後 25-26 時間に実施することとした。
- ④ このとき、歩数計(牛歩:コムテック)による発情開始時間を基準とすることも考えられたが、GnRH 投与を基準とした方が排卵のバラツキが少なく排卵時間が集中する傾向があることが判明したため、GnRH 投与を基準とした。
- ⑤ さらに、排卵時間の調査から最も排卵が集中したのは GnRH 投与後 29-32 時間であり、排卵の平均時間が約 30 時間であったことから、GnRH 投与後 30 時間目に IVF を開始することとした。
- ⑥ ただし、卵子の受精能保持時間は 8 時間以上とされていることから、IVF 開始が 4 時間遅れても受精率には大きな影響はないと考えられる。
- ⑦ ドナーは発情周期の正常な牛を選抜する。
- ⑧ 極端にエネルギーバランスが負の牛(体重が極端に減少している牛)は卵胞数が減少する傾向があり、多排卵処置を避ける。
- ⑨ 主席卵胞除去時(5 日目)の超音波診断装置による卵巣観察で小中卵胞数により多排卵処置の是非を決めることができる。卵胞数が 10 個に満たない牛は FSH への良好な反応が期待できないため、処置を中止することも検討したほうが良い。



図 2. 超音波診断装置を用いた経膣採卵による生体内卵子の採取

2) 経膈採卵による体内成熟卵子採取法

1. 体内成熟卵子の OPU における器具機材は一般の未成熟卵子の OPU と同じものを用いる(図 2)。
2. 吸引液(乳酸加リンゲル液+1%子牛血清(CS)+10U/mL ヘパリン)を作製する。
3. 吸引直前に採卵針、チューブおよび卵胞液採取管に温めた吸引液(30°C)を少量入れる。
4. 吸引圧は未成熟卵子吸引の 2 割増しとする(例:吸引量=25mL/min、130-150mmHg)。
5. プローブを膈に挿入する。次いで直腸より入れた手で卵巢を保定し、プローブにあて、超音波像を得る。
6. 超音波像から膈壁より採卵針を誘導し、5mm 以上の卵胞を穿刺して卵子を卵胞液ごと吸引採取する。
7. 成熟卵子を含む卵胞液は粘性が高いため、吸引時に卵胞液が消失しても数秒はそのまま保持する(図 3)。
8. この卵胞穿刺を繰り返し、卵胞を 5-7 個ずつ吸引したら卵胞液採取管(50mL 遠心管)を新しいものに交換する。
9. 採取した卵胞液採取管は 30°C に保温し、卵子を検索する実験室へ持ち帰る。

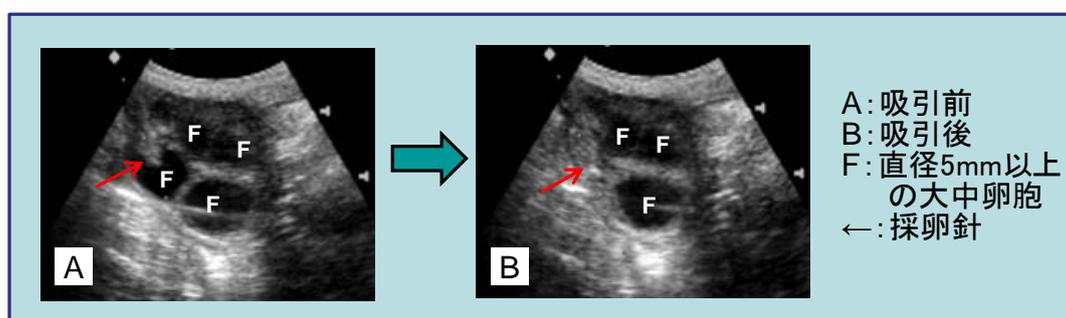


図 3. OPU による大卵胞の吸引とその消失

(解説)

- ① 未成熟卵子の OPU との違いは、成熟卵子を取り囲む卵丘細胞および顆粒膜細胞がヒアルロン酸などを産生し、膨潤化して粘張性が高く、吸引される細胞の容積も大きいため採卵針および接続チューブが詰まり易いことがあげられる。
- ② そのため、常に採卵針および接続チューブ内の採取液の動きに注意する。
- ③ 卵胞液がチューブ内で詰まったときは、吸引圧を最大として解消する。それでも解消されないときは、19G の針を付けた 5mL 注射筒を用い、COVA ニードル先端に 19G の針を挿入し、吸引液を注入する。
- ④ 卵胞を 5-7 個吸引した後採取管を交換するのは、吸引した液(卵子、卵胞内の細胞、卵胞液、血液および卵子採取液が混在)への血液の混入を最低限とするためである。

- ⑤ さらに、吸引した液に血液の混入が多い場合、血球を除去するためにフィルターにかけるが、このとき一度に多くの卵胞を吸引した液をフィルターにかけると目詰まりする、そのため1本の遠心管には5-7個の卵胞吸引液しか入れない。

3) 卵子の検索

1. 遠心管を静置し、卵子、卵丘細胞および顆粒膜細胞を沈殿させる。
2. 沈殿物を10mLピペットで吸引し(約1mL)、卵子検索用のシャーレ(直径90~100mm)に移して1%CS添加乳酸加リンゲル液を加え、卵子を検索する。
3. 卵子の検索は実体顕微鏡下で行う(図4-A)。
4. 卵子は保存液(修正TCM199 + 5%新生子牛(NCS)血清)の入った35mmシャーレに移す。
5. 顆粒膜細胞や卵丘細胞の容積が大きく、シャーレの中で卵子を見つけるのが難しい場合は、シャーレの蓋に細胞塊をパスツールピペットで移し、図4-Bのように注射針や検索棒で細胞塊を薄く伸ばし、卵子を検索する(図4-C)。
6. 卵丘細胞は膨潤化して粘張性高く、そのままではマウスピペットへの吸入が困難なため、19-22Gの注射針を用いて卵丘細胞から卵子を切離し(図4-D)、35mmのシャーレに移す。
7. 卵丘細胞をトリミングし、卵子周囲に数層残して成熟培地(TCM199 + 5%NCS)を用いて2回洗浄、媒精まで培養する(トリミング前:図4-E、トリミング後:図4-F)。
8. 最後に卵胞液採取管の残液をまとめてエムコンフィルターに入れ、卵子吸引液を数回に分けて入れながら透明になるまで濾過し、卵子検索用のシャーレに移して卵子の取り残しがないか確認する。
9. 採取した卵子はその形態により成熟卵子(図5-A)および未成熟卵子(図5-B)に分類し、それぞれ培養する。
10. 成熟卵子は成熟培地のドロップ(1卵子=5 μ L;最低20 μ L)に移し、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気、湿度飽和下で、2-3時間(GnRH投与後30時間目まで)培養する。
11. 未成熟卵子を体外受精する場合は、22-23時間体外成熟培養を行う。

(解説)

- ① 採取した顆粒膜細胞-卵丘細胞-卵子の複合体は膨潤化しており、区別が付きにくい、卵丘細胞の方が顆粒膜細胞よりも透明度が高く、その中に卵子が存在する。
- ② 膨潤化した卵丘細胞はピペットや攪拌棒では切れない。そのため、針を使って切る。
- ③ 血液が混入して見づらい時は、静置して赤血球がしずむのを待つ、あるいはフィルターを再度かける必要がある。
- ④ 1%子牛血清添加ハルゼン液に卵子を長時間(2時間以上)入れておくと発生率

が低下する恐れがあるので、なるべく早く保存液に卵子を移す。

- ⑤ 最後に卵子が残っていないか確かめるため、以下の手順で再度卵子の検索を実施することも可能である。まず、回収液(細胞塊を含む)を遠心管に集め、1000rpm、5 分間の遠心後、上清を除去し、0.1%ヒアルロニダーゼを 1mL 入れ、2~3 分間攪拌する。細胞塊がバラバラになったら、1%CS 添加乳酸加リンゲル液を加えて攪拌し、2-3 分間静置、上清を除去して 1%CS 添加乳酸加リンゲル液を加え、シャーレに移し卵子を検索する。
- ⑥ 注意点として、OPU で採取した体内成熟卵子の検索は未成熟卵子のそれと比べて、煩雑で時間を要する。そのため、検索する技術者が少ない事業所においては、一度に OPU を実施する頭数を制限した方が良いと考える。

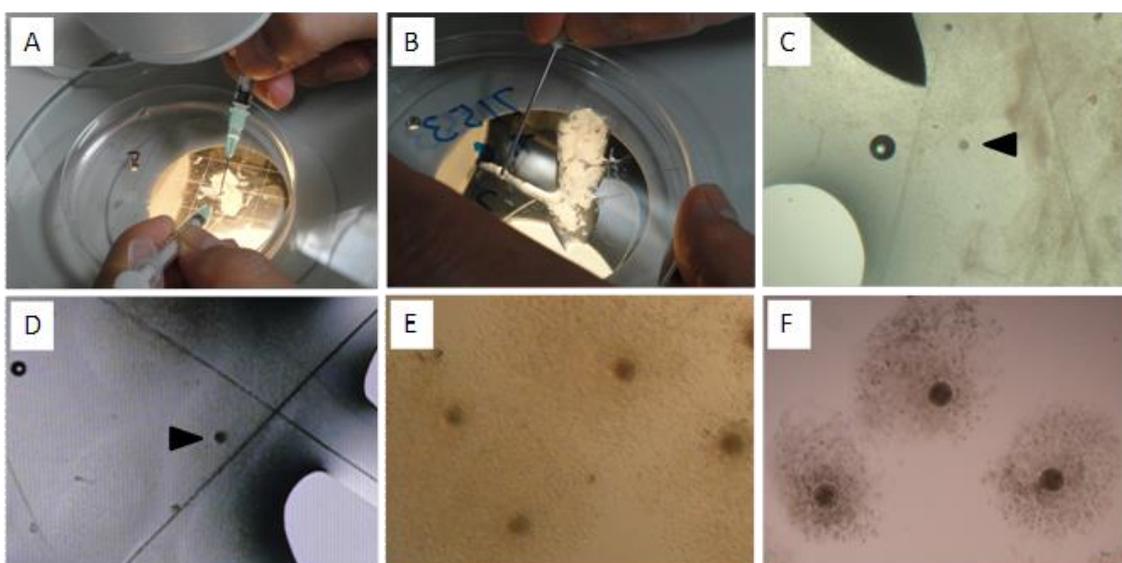


図 4. 卵子の検索と卵丘細胞のトリミング

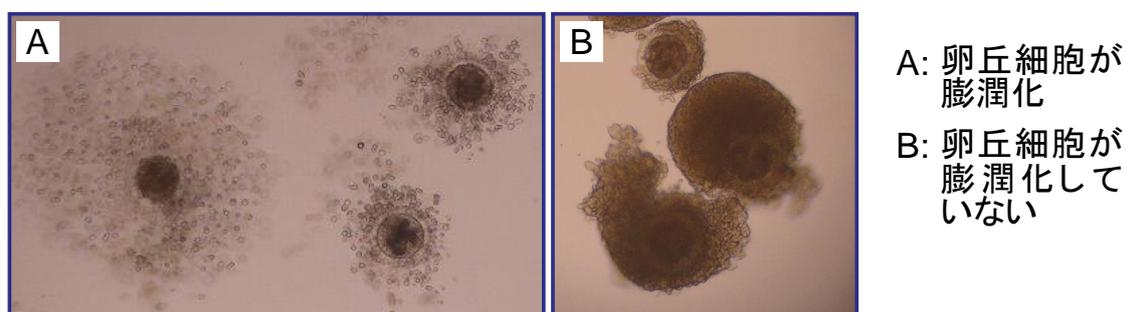


図 5. 体内成熟卵子(A)および未成熟卵子(B)の形態

3. 体外受精

1) 精液の融解と洗浄

1. 密栓して 37°C に保温した 60% と 45% パーコール密度勾配液を、2 mL ずつ 15 mL 遠沈管に重層する。
2. その上に凍結融解した性選別精子を重層する(図 6)。
3. 37°C、2000rpm(740 × g) で 10 分間遠心分離し、精子と夾雑物を分離する。
4. 上澄みを精液ペレットの上限までアスピレーター等で吸引除去する。
5. 37°C に加温した IVF100(機能性ペプチド研究所)を 5.5 mL 添加する。
6. 2~3 回静かに反転混和したのち、37°C、1800rpm(540 × g) で 5 分間遠心分離する。
7. 上澄みを吸引除去し、37°C に加温した IVF100 を約 40 μL 添加し、タッピングで静かに全体を混和する。

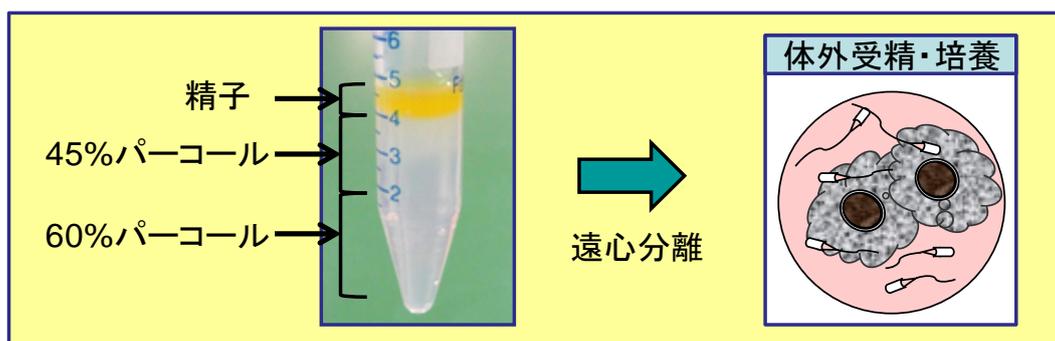


図 6. パーコールおよび精液の重層と体外受精

(解説)

- ① パーコール密度勾配液は混合しやすいため、遠心管を斜めに傾けマイクロピペットを用いて液面近くにゆっくり静かに入れる。
- ② 45%と60%のパーコールを用いているのは性選別精液を使うからであり、一般精液では45%と90%パーコールを用いる。
- ③ 精液はマイクロピペットを用いるか、精液ストローの綿栓部分を半分にカットして押棒で押し出し、パーコール密度勾配液の上にゆっくり重層する。この時も遠心管を斜めに傾けると混合を防ぐことができる。
- ④ 凍結精液に含有されている物質と IVF100 液が混合されると、精子浮遊液が白濁し、卵子が観察できないことがあるため、上澄み液は精子ペレットの上限まで吸引除去する。
- ⑤ これらの処理は、凍結精液に含まれる凍結保護物質および精漿などの夾雑物を洗浄除去し、精子の受精能獲得を促すものである。
- ⑥ 精子の処理は 37°Cで行うのが望ましいが、できない場合はできるだけ 37°Cに

温度を近づける。

- ⑦ 2 回目の遠心分離の後、加える IVF100 の量は精子数により、変更する。性選別精液の場合は 40 μ L、一般精液の場合は 300 μ L 程度とする。

2) 精子濃度の調整

1. 媒精用シャーレは、空のシャーレの底に IVF100 を 1 μ L ずつドロップにし、オイルカバーして使用するため、2 時間以上前からガス平衡しておく。
2. 血球計算盤を準備する。
3. PCR チューブに 3 % NaCl を 99 μ L 入れ、混和した精子浮遊液を 1 μ L 加える。すなわち 100 倍希釈する。
4. 残りの精子浮遊液の量はマイクロピペットを使い計量する。
5. PCR チューブをボルテックスミキサー等でよく混和する。
6. 混和した液を血球計算板に入れて精子数をカウントする。
7. IVF100 で最終精子濃度が 100 万-500 万精子/mL (種雄牛により異なる) となるよう精子浮遊液量を調製する。
8. 媒精用シャーレのドロップに精子浮遊液を加え、必要な数のドロップ (~100 μ L/ドロップ) に分注する。
9. 卵子を IVF100 で洗浄し、精子浮遊液のドロップに移し (~25 個の卵子/1ドロップ)、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気、湿度飽和下で 6 時間媒精する。

(解説)

- ① 性選別処理あるいは種雄牛によって卵子の精子進入時間が異なる。
- ② マイクロピペットでの精子浮遊液の計量は精子浮遊液をある一定量マイクロピペットで吸引し、その後ピペットのつまみを廻しダイヤルを上昇させ、液が無くなったところで、値を読み取り、量を推定する。

4. 体外発生培養

1. 発生培地: CR1aa + 0.25 mg/mL リノール酸アルブミン (LAA) + 5%NCS を準備する。
2. 発生培地中で卵丘細胞と精子をピペッティングにより完全に剥離除去し、卵子を洗浄する。
3. 洗浄後の卵子を、オイルカバーした発生培地のドロップ (1 卵子=5 μ L; 最低 20 μ L) に移し、38.5°C、5%CO₂、5%O₂、90% N₂、湿度飽和下で媒精日を 0 日として、7-9 日間培養する。
4. 媒精開始後 48 時間目に卵割検査を実施する。
5. 発生した胚盤胞を移植または凍結保存に用いる (図 7)。

(解説)

- ① CR1aa に LAA を添加することで、発生した体外受精胚の耐凍性が向上する。
- ② ピペットが卵子直径より小さいと卵細胞質にダメージを与え、発生率が低下する。そのため、卵子の直径より大きめのピペットで卵子をこすり合わせながら卵丘細胞を剥離する。
- ③ 卵丘細胞を完全に剥離除去することで、過大子発生の確率が減少する。
- ④ 媒精開始後 27 時間で 2 細胞期に達し、55 時間で 6 細胞以上に発生している体外胚は受胎率が高いという報告がある。
- ⑤ 凍結保存後の生存性は拡張胚盤胞、胚盤胞、桑実胚の順に高い。

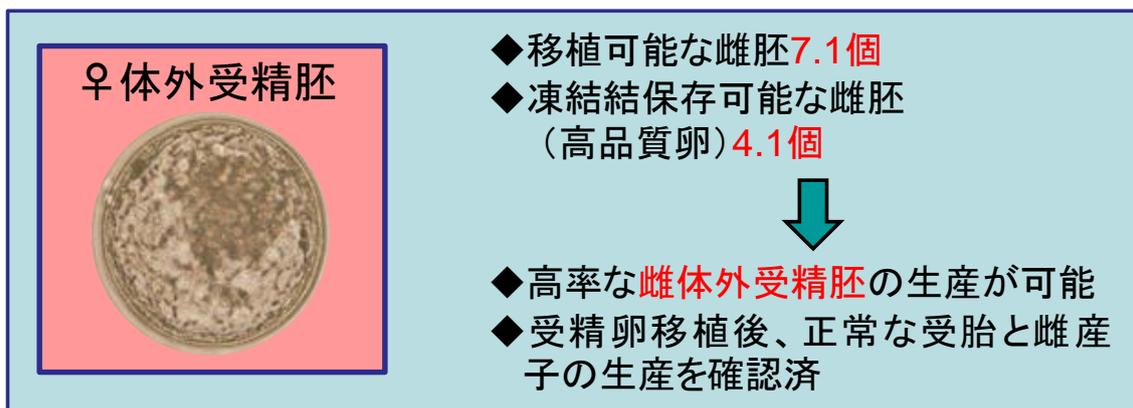


図 7. 性判別された体外受精胚の生産とその効率

5. 体外受精胚の凍結保存と融解

1) 凍結保存

- ①平衡液: 1.36M グリセリン(Gly)+ 20 %NCS 添加修正 TCM199
②凍結媒液: 1.36M グリセリン(Gly)+ 0.25M シュクロース(Suc)+ 20 %NCS 添加修正 TCM199
③希釈液: 0.25M Suc + 20 %NCS 添加修正 TCM199 を準備する。
2. 平衡液中に胚を 10 分間浸漬する(胞胚腔の再拡張の観察)。
3. 胚を 1cm の長さの凍結媒液(約 30 μ L)と共に凍結媒液の入ったシャーレに移し、15 分以内(胚が沈んだらすぐにでも良いです)にストロー内へ装填する(図 8)。
4. あらかじめ植氷温度(-6.0 $^{\circ}$ C)にしたプログラムフリーザーにストローをセットする。
5. アルコールバスにセットし、1分経過後に植氷操作(胚層の上の希釈液層)を行う。
6. 植氷後の植氷温度保持時間は9分間とする。
7. その後-0.33 $^{\circ}$ C/min で-25 $^{\circ}$ Cまで冷却し、-25 $^{\circ}$ Cで 5 分間保持後、液体窒素に投入する。

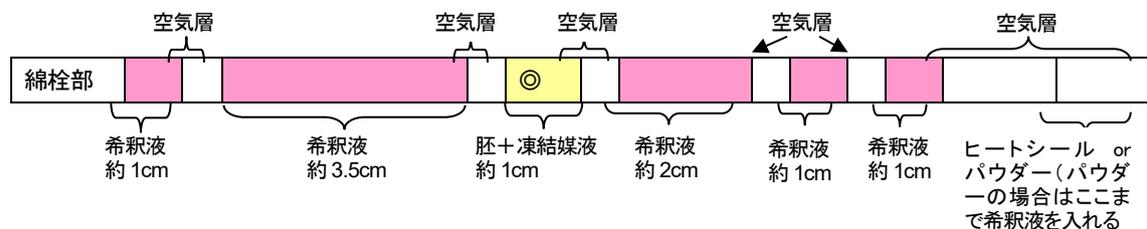


図 8. ストローへの胚の充填方法

(解説)

- ① 各溶液の調整には NCS を添加せず濾過滅菌して各溶液(各 4 mL または 8 mL に分注する)を-30 $^{\circ}$ C以下で凍結保存しておくことと便利である。使用時に融解し、濾過滅菌した血清を加えるだけで使用可。
- ② 拡張胚盤胞が胚盤胞に比べて凍結・融解後の生存率が高いため、拡張胚盤胞の時期に緩慢凍結することが実用的である。特に直径 180 μ m 以上に発育した胚盤胞は生存性が高い。
- ③ 平衡液の中で胞胚腔が再拡張した胚盤胞の凍結融解後の生存性は高い。これは耐凍剤の細胞膜透過性を指標とした評価法である。
- ④ 拡張胚盤胞を凍結媒液に入れてプログラムフリーザーにストローをセットするま

でが 15 分間であり、それ以上長くする必要はない。

- ⑤ あらかじめストローに綿栓側の前平衡液を吸引しておく、短時間でストローへの胚の充填が終了する。

2) 融解および受精卵移植

1. ストローカッターをアルコール綿で消毒する。
2. 受精卵移植器やシース管など移植に必要な器具を順序よく並べて準備する。
3. ストローを液体窒素から取り出し、空気中で 10 秒間保持し、30°Cの温湯に移して融解する。
4. 氷晶が消えたら(20 秒間)ストローを取り出す。
5. 固く絞ったアルコール綿でストローを拭く。
6. シール部分をストローカッターでカットして受精卵移植器にセットする。
7. 受胚牛に移植する。

(解説)

- ① 受精胚は外気温、光によるダメージを受けるため注意する。
- ② 移植はなるべく短時間で終了させる。そのため、1 人で移植をする場合、受胚牛の準備(除糞、外陰部の消毒、尾椎硬膜外麻酔など)は受精胚の融解前に終わらせておく。
- ③ また、2 人で移植を行う場合、移植者が全ての準備を完了した後、補助者が受精胚を融解、移植器にセットして直ちに移植する。

6. 各種溶液の調整

<OPU>

◎1%CS 加 乳酸加リンゲル液(1L):採取卵子検索・洗浄用

乳酸加リンゲル液	1,000 mL
CS	10 mL
抗生物質 PC-SM(29 頁参照)	1,000 μ L

- ① 市販の乳酸加リンゲル液 1,000mL に、CS を 10mL 入れ、抗生物質を 1,000 μ L 添加して転倒混和
- ② 保存する場合は、冷蔵保存(約 1 週間)
* OPU から卵子検索に時間が掛かる場合は、以下の卵子検索・保存液を用いる。

◎10U/mL ヘパリン加 1%CS-乳酸加リンゲル液:OPU 卵子吸引液

1%CS 加 乳酸加リンゲル液	100 mL
ノボヘパリン(1,000 U/mL)	1 mL

- ・上記 1%CS 加 乳酸加リンゲル液にノボヘパリンを 1mL 加える。調製量は、施術頭数により変更

<卵子の検索・保存液>

◎11mM Hepes、9mM Na-Hepes 緩衝 TCM-199(1,000mL):修正 TCM199

a) TCM-199 粉末 (1,000 mL 用)	1 袋	
b) 重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	0.42005 g
c) HEPES		2.62 g
d) HEPES sodium salt		2.35 g
e) 抗生物質 PC-SM		1,000 μ L

- ① a)を約 800mL の超純水(シグマアルドリッチ:Water for embryo transfer)に溶解
- ② b)の試薬を加え、よく攪拌(最終的に 5mM とする)
- ③ 別の容器で、c)と d)を約 100mL の超純水に溶解し、混和したら②に添加(最終的にそれぞれ 11mM、9mM とする)
- ④ e)を③に混和し、超純水で 1,000mL にメスアップししばらく攪拌
- ⑤ 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、滅菌済み小瓶または遠沈管(95mL または 47.5mL)に分注し、冷蔵保存する(約 1 ヶ月間)

◎5%NCS 加 9mM Hepes、11mM Na-Hepes 緩衝 TCM-199(100mL): 卵子の検
索・保存液

修正 TCM199	95 mL
NCS	5 mL
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① 分注した修正 TCM199 に NCS を 5% になるように添加して転倒混和
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する(約 1 週間)。

< 卵子の培養 >

◎5%NCS 加 25mM Hepes 緩衝 TCM-199(100mL): 成熟卵子培養液

25mM Hepes 緩衝 TCM-199	95 mL
NCS	5 mL
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① メスシリンダーに上記試薬を入れ、開口部をパラフィルムで被い転倒混和
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

◎5%NCS および 0.002AU/mL FSH 加 25mM Hepes 緩衝 TCM-199(100mL):
未成熟卵子培養液

25mM Hepes 緩衝 TCM-199	95 mL
NCS	5 mL
FSH(10AU を PBS 5mL に溶解)	100 μ L
抗生物質 PC-SM	100 μ L

- ① メスシリンダーに上記試薬を入れ、開口部をパラフィルムで被い転倒混和
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

<精子処理>

1. パーコール液関連の調製

凍結融解後の生存精子を選別する際に45%および60%パーコール液を用いるが、パーコール液(100%濃度:Percoll)を希釈するために10倍濃度の sperm TL を調製

◎10倍濃度 sperm TL (100mL) : Percoll 希釈液

塩化ナトリウム	NaCl	4.675 g
塩化カリウム	KCl	0.230 g
リン酸二水素ナトリウム(無水)	NaH ₂ PO ₄	0.035 g
		(*上記が NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O なら 0.0455 g)
Hepes		2.380 g

- ① ビーカーに50mL程度の超純水を入れ、上記薬品を溶解
- ② pHメーターを用いてpH=7.3に調製(NaOHを用いる)
*この液はpHが極めて低いため、約半分の溶液量で調製し、NaOHを加えていくことでpH=7.3に調製
- ③ メスシリンダーに溶液を移し、100mLにメスアップ

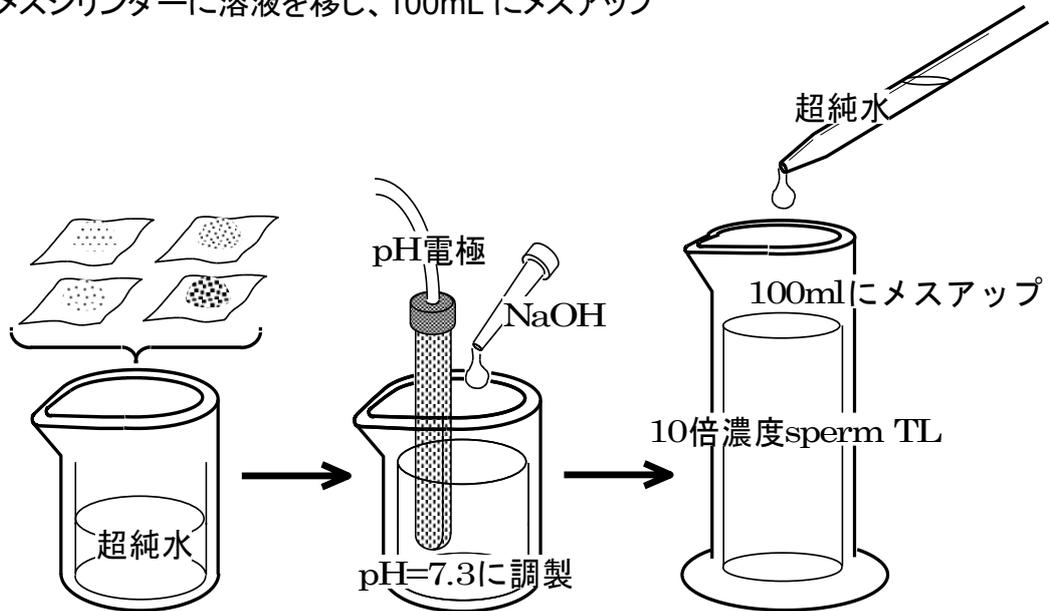


図9. 10倍濃度 sperm TL の調製

◎90%パーコール液 (50mL) : 生存精子選別溶液

a) Percoll		45 mL
b) 10 倍 sperm TL		5 mL
c) 塩化カルシウム 1M 水溶液	CaCl ₂	98.5 μL
d) 塩化マグネシウム (六水塩) 0.1M 水溶液	MgCl ₂ · 6H ₂ O	197 μL
e) DL-Lactic acid (syrup)		184 μL
f) 重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	0.1045 g
g) 0.5% フェノールレッド		10 μL
* c) 1M CaCl ₂ : 1.1098g/10mL		
1M CaCl ₂ ·2H ₂ O : 1.4701g/10mL		
d) 0.1M MgCl ₂ · 6H ₂ O : 0.2985g/10mL		

- ① a)と b)を混和し、50mL に調製
- ② c)~g)の試薬を加え、転倒混和
- ③ 0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

◎45%パーコール液 (50mL) : 生存精子選別溶液

a) Percoll		22.5 mL
b) 10 倍 sperm TL		5 mL
c) 塩化カルシウム 1M 水溶液	CaCl ₂	98.5 μL
d) 塩化マグネシウム (六水塩) 0.1M 水溶液	MgCl ₂ · 6H ₂ O	197 μL
e) DL-Lactic acid (syrup)		184 μL
f) 重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	0.1045 g
g) 0.5% フェノールレッド		10 μL
h) 純水 (ミリQ水)		22.5 mL

- ① a)、b)および h)を混和し、50mL に調製
- ② c)~g)の試薬を加え、転倒混和
- ③ 0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存

◎60%パーコール液 (10mL) : 生存精子選別溶液

90%パーコール液	3mL
45%パーコール液	6mL

混合して 60%パーコール液 9mL となる

<発生培養>

1. CR1aa の調製：発生培養の基礎培地（NCS および LAA を添加して使用）
予めストック液（CR1-A 液および CR1-B 液）を調製する

◎CR1-A 液（760mL）：CR1aa 調製用ストック液

塩化ナトリウム	NaCl	6.7031 g
塩化カリウム	KCl	0.2311 g
ピルビン酸ナトリウム		0.0440 g
重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	2.2011 g
0.5%フェノールレッド		2.0 mL

- ① 1 リットルのメスシリンダーに上記試薬を超純水で順次溶解し、760mL までメスアップする。
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

◎CR1-B 液（200mL）：CR1aa 調製用ストック液

L(+)-Lactic Acid Hemicalcium Salt	0.5996 g
-----------------------------------	----------

- ① 200mL のメスフラスコに上記試薬を超純水で溶解し、メスアップする。
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 ヶ月間）。

◎CR1aa（100mL）：発生培養の基礎培地（NCS および LAA を添加して使用）

a) CR1-A 液	76 mL
b) CR1-B 液	20 mL
c) BME Essential Amino Acids (× 50)	2 mL
d) MEM Nonessential Amino Acids (× 100)	1 mL
e) L-Glutamic acid (0.02 g を超純水 10mL で溶解して使用)	1 mL
f) BSA (Fatty Acid-free)	0.3 g
g) 抗生物質 PC-SM (29 頁参照)	100 μ L

- ① ビーカー等に a)～e)をメスピペットで入れ混和する。
- ② BSA (Fatty Acid-free)を静置溶解する。
- ③ 抗生物質 PC-SM を入れ、混和する。
- ④ 血清を添加して使用する場合は、5%NCS 加 CR1aa の調製に従う。
- ⑤ 血清を添加しない場合は、0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する（約 1 週間）。

◎5%NCS 加 CR1aa (105.26mL) : 発生培養液

CR1aa	100 mL
NCS	5.26 mL

- ① 100mL の CR1aa に、NCS を 5.26mL 加え転倒混和する。
- ② 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する(約 1 週間)。

2. リノール酸アルブミン (LAA) : 体外受精胚の耐凍性を向上

◎50mg/mL LAA ストック液 (10mL) : 5%NCS 加 CR1aa に添加するストック液

LAA (500mg) の瓶に CR1-A 液を 10mL 加え、完全に溶解する(約 1 ヶ月間)。

◎0.25mg/mL LAA+5%NCS 加 CR1aa (10mL) : 耐凍性を向上させた発生培養液

- ① 5%NCS 加 CR1aa 10mL からマイクロピペットを用いて 50 μ L 取り除く。
- ② LAA ストック液を 50 μ L 加え、転倒混和する。
- ③ 0.22 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌し、冷蔵保存する(約 1 週間)。

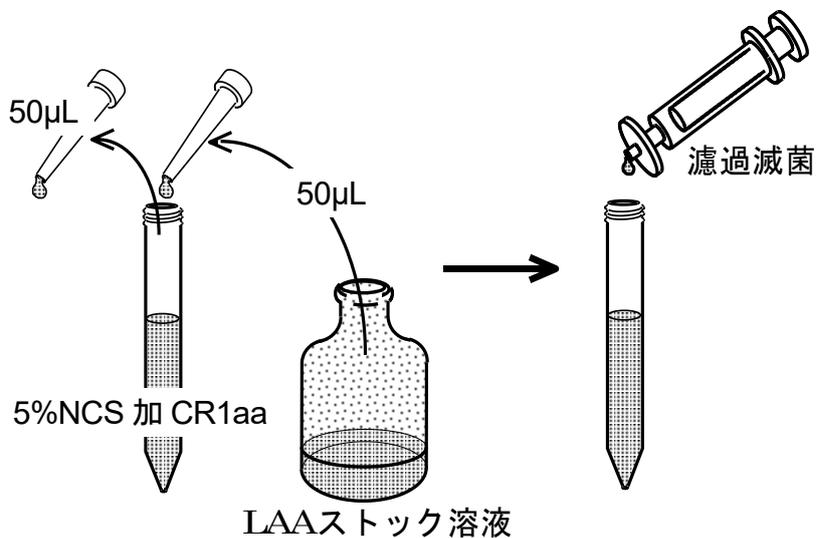


図 10. 0.25mg/ml LAA+5%NCS 加 CR1aa の調製

7. 試薬と器具(一例)

1. 試薬

名称	メーカー	カタログ番号	容量
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Modified	シグマアルドリッチ	D4031	500mL
Medium 199 Earle's, Powder	ライフテクノロジーズ (GIBCO)	31100-035	1L 用粉末 x10 袋
Medium 199 Earle's, liquid	ライフテクノロジーズ (GIBCO)	12340-030	500mL
Hepes	シグマアルドリッチ	H7523	50g
HEPES sodium salt	シグマアルドリッチ	H8651	100g
Water for embryo transfer (超純水として使用)	シグマアルドリッチ	W1503	500mL
流動パラフィン	ナカライ	26114-75	500mL
Bovine Serum	ライフテクノロジーズ (GIBCO)	1670-078	500mL
New Born Calf Serum	フナコシ	S0750	500mL
塩化ナトリウム, NaCl	和光純薬	191-01665	500g
塩化カリウム, KCl	和光純薬	163-03545	500g
リン酸二水素ナトリウム・二水塩, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	和光純薬	192-02815	500g
水酸化ナトリウム溶液, 1mol/L	シグマアルドリッチ	28-3010-5	500mL
水酸化ナトリウム溶液, 0.1mol/L	シグマアルドリッチ	28-3040-5	500mL
Percoll	シグマアルドリッチ	P4937	500mL
	GE Healthcare	17-0891-01	1L
塩化カルシウム・二水塩, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	和光純薬	031-00435	500g
塩化マグネシウム・六水塩, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	和光純薬	135-00162	500g
DL-lactic acid sodium salt (syrup)	シグマアルドリッチ	L7900	100mL
重炭酸ナトリウム, NaHCO_3	和光純薬	191-01305	500g
IVF100	機能性ペプチド研究所	IFP9630	30mLx5 本
Sodium pyruvate	シグマアルドリッチ	P3662	25g

Phenol red solution, 0.5%	シグマアルドリッチ	P0290	100mL
Lactic acid, hemicalcium salt	シグマアルドリッチ	L2000	50g
BME Amino acid solution	シグマアルドリッチ	B6766-100	100mL
MEM Amino acid solution	シグマアルドリッチ	M7145-100	100mL
L-Glutamic acid	シグマアルドリッチ	G8415	100g
BSA, fatty acid free	シグマアルドリッチ	A7030	10g
Linoleic Acid-Albumin	シグマアルドリッチ	L8384	500 mg
グリセリン	和光純薬	072-04945	500mL
Sucrose, ultra-pure	Organics (代理店: フナコシ)	0928S	500g
Beta-mercaptoethanol	シグマアルドリッチ	M7522	100mL
エチレングリコール	和光純薬	058-00986	500mL
BSA, fraction V	シグマアルドリッチ	A9647	50g
GOLD Fetal Bovine Serum	MP Biomedicals	1916554	500mL
HYALURONIDASE	シグマアルドリッチ	H3506	5g

2. 動物薬、医薬

名称	メーカー	カタログ番号	容量
CIDR1900	ファイザー		10 個/袋
アントリン R10 (FSH)	共立製薬		5mLx5A
スポルネン注 (酢酸フェルチレリン)	共立製薬		2mLx5A または 10mL
ダルマジン (d-クロプロステロール)	共立製薬		2mLx10 本 または 20mL
動物用塩プロ注	共立製薬		100mL
乳酸加リンゲル液	日本全薬工業	ハルゼン V	1Lx20 本
ノボ・ヘパリン注	持田製薬		(1 万単位 /10mL)x10 本/箱
イゾジンスクラブ液 7.5%	明治製菓株式会社		500mL
逆性石けん液(塩化ベンザルコニウム 10%)	日本製薬株式会社	オスバン S 液	600mL
ペニシリン G カリウム	Meiji Seika ファルマ		20 万単位 x10 バイアル

硫酸ストレプトマイシン	Meiji Seika ファルマ		1g 力価
-------------	------------------	--	-------

3. 器具

名 称	メーカー	カタログ番号	容 量
ディッシュ, 直径 90mm	NUNC	172958	240 枚
	アズワン	D-210-16	10 枚 x50 袋
ディッシュ, 直径 35mm	BD Falcon	1008	20 枚 x25 袋
	NUNC	153066	500 枚
遠沈管, 50mL	アシスト	62.559S	25 本 x 12 袋
	BD Falcon	352070	500 本
遠沈管, 15mL	アシスト	62.553.041S	
	BD Falcon	352196	500 本
パスツールピペット	ヒルゲンベルグ	3150101	1,000 本
PCR チューブ (Snap Seal Microtube)	BM	NT-172	0.6ml
フィルターユニット	NUNC	566-0020	0.2 μ m, 500mL, 12 個
受精卵回収フィルター	エムコン	04135	
フィルターユニット	NUNC	568-0020	0.2 μ m, 250mL, 12 個
フィルター	Sartorius	16534-K	Minisart 0.2 μ m, 50 個
細胞計算盤	アズワン	2-7732-21	50 枚

4. 医療器具

名 称	メーカー	カタログ番号	容 量
ディスプレイブル採卵針動物 用(滅菌済み卵子採取用器具)	御澤医科工業	A-タイプ (超音波診断 装置の機種に より異なる)	17G, 500mm, 20 本
超音波画像診断装置	ALOKA	SSD-900	

動物用電子コンベックス探触子 (プローブ)	ALOKA	UST-9109P- 7.5	
採卵針ガイド	FHK		
吸引器	FHK	Model FV4	
恒温器	FHK	Model FV5	
注射針	19G, SB		
注射針	21G, SB		

本マニュアルは、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「生体内吸引卵子と性選別精子を用いた効率的な体外胚生産技術の開発(22016)」の助成により発行した。

執 筆 独立行政法人家畜改良センター技術部技術第一課および独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構 畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域

発 行 独立行政法人家畜改良センター技術部技術第一課(平成 25 年 2 月)

* 超音波画像診断装置は日立アロカ社となり、当時の機種は販売終了となった。

* 吸引器は新機種 FV6 に更新された。

平成 29 年 5 月 9 日更新

平成 29 年 11 月 6 日改定